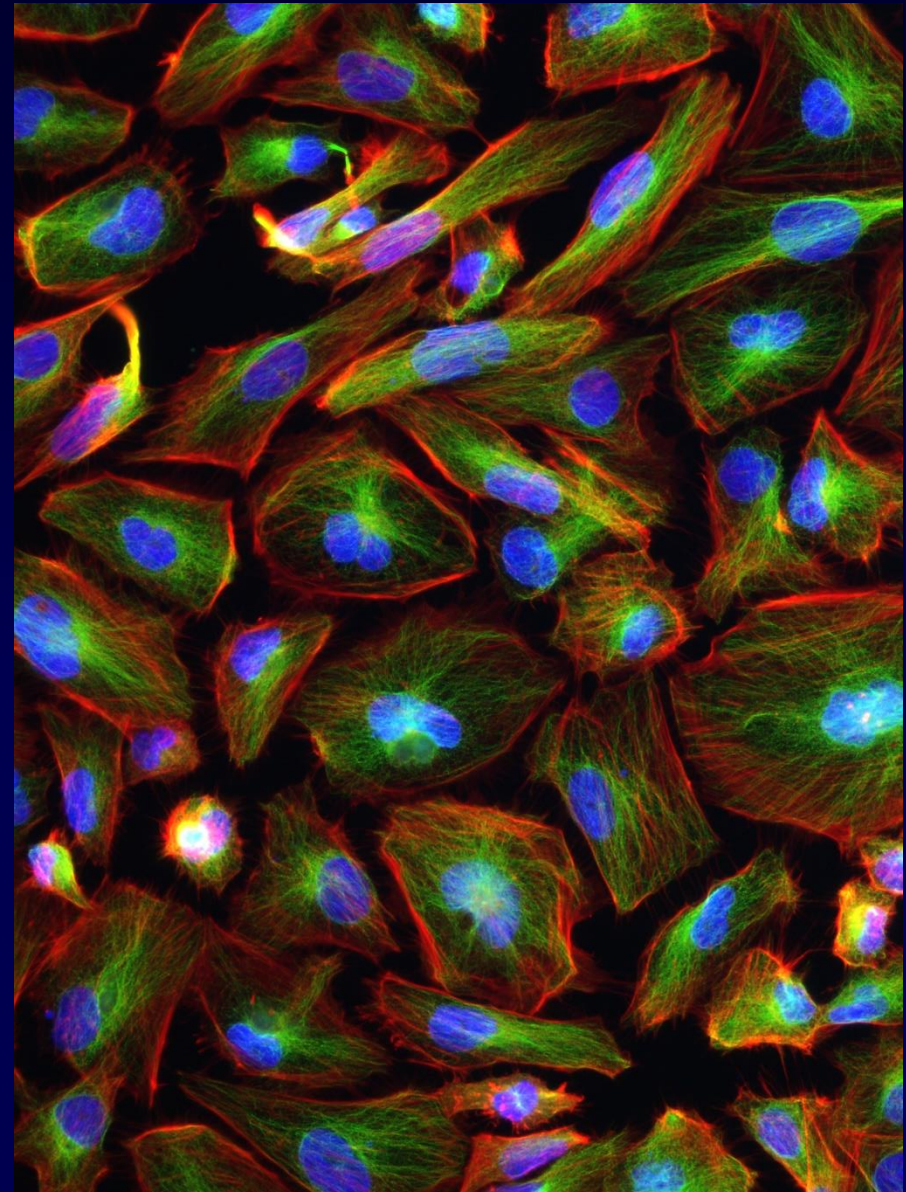


# Principy a postupy imunofluorescenčního značení buněk

doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



## Program přednášky:

- imunocytochemie
- typy protilátek a jejich výroba
- postup imunofluorescenčního barvení

## Nevlastní (vnější) fluorescence

Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury - **sondy**

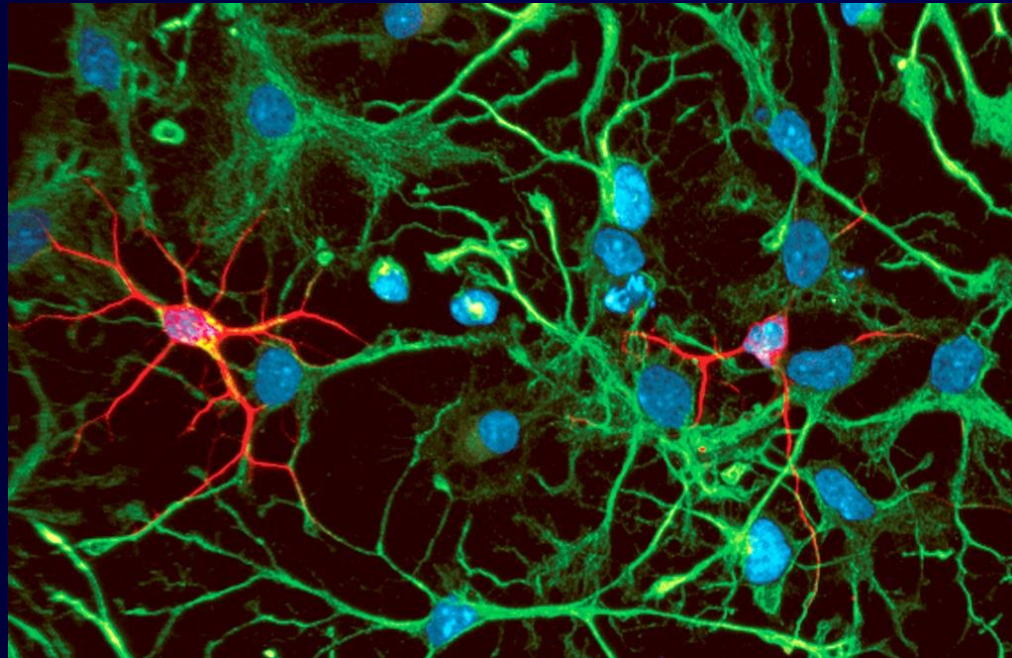
DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána...  
mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH  
indikátory, membránový potenciál.

Nepřímá vazba fluorochromu – **značky + molekulární prostředník**

vazba značky na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, annexin V, phalloidin..

# Imunocytochemie (ICC) / imunohistochemie (IHC)

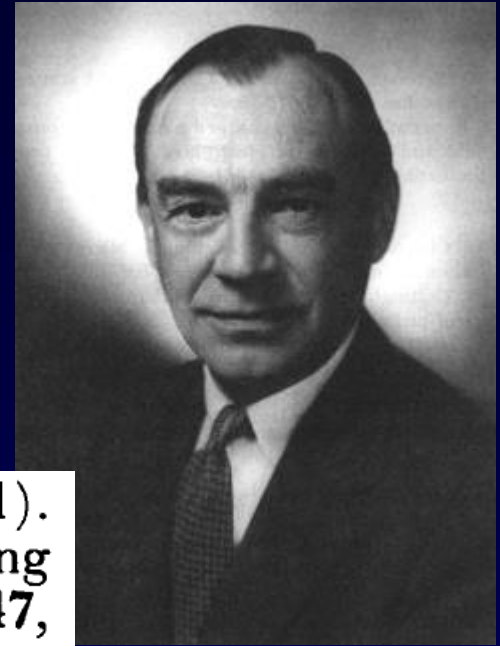
- soubor metod, které umožňují detekci antigenu v buňce nebo v tkáni (*in situ*)
- pomocí značených protilátek



# Albert Hewett Coons

(1912 - 1978)

- zakladatel imunofluorescence
- použití fluorochromem značené protilátky



COONS, A. H., CREECH, H. J. and JONES, R. N. (1941).  
'Immunological properties of an antibody containing  
a fluorescent group.' *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **47**,  
200.

## LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS

### II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY\* ‡

BY ALBERT H. COONS, M.D., AND MELVIN H. KAPLAN§

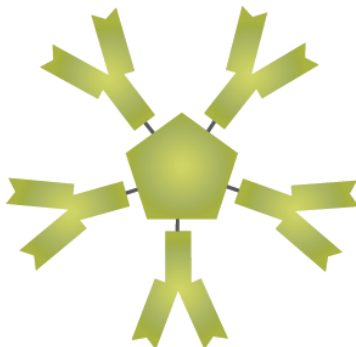
(From the Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, Boston)

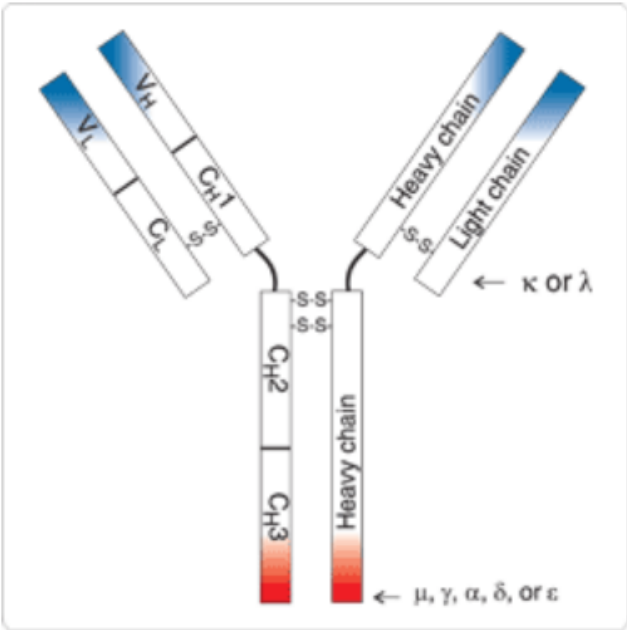
(Received for publication, August 6, 1949)

# Protilátky

- patří do skupiny imunoglobulinů
- **třídy**: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM (u savců)
- **složení**: 2x těžký řetězec (H), 2x lehký řetězec (L)
- **H řetězce**: různé dle antigenních a strukturálních vlastností Ig  
-> podtypy (alfa, delta, epsilon, gama, mí)
- **L řetězce**: lambda nebo kapa – různě, v závislosti na typu Ig
- H a L – spojení disulfidickými vazbami, podíl na terciární struktuře, udržuje stabilitu Ig
- nejčastěji pro imunofluorescenci IgG a IgM



| Name        | Heavy Chain | Description                                                                                                                                                                                                                   | Antibody Complexes                                                                                                    |
|-------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgA 1,2     | $\alpha$    | Found in mucosal areas, such as the gut, respiratory tract and urogenital tract, where it prevents colonization by pathogens. Also found in saliva, tears, and breast milk.                                                   |  <p>Monomer:<br/>IgD, IgE, IgG</p> |
| IgD         | $\Delta$    | Functions mainly as an antigen receptor on B cells that have not been exposed to antigens. It has also been shown to activate basophils and mast cells to produce antimicrobial factors.                                      |                                                                                                                       |
| IgE         | $\epsilon$  | Binds to allergens and triggers histamine release from mast cells and basophils, and is involved in allergy. Also protects against parasitic worms.                                                                           |  <p>Dimer:<br/>IgA</p>             |
| IgG 1,2,3,4 | $\gamma$    | In its four forms, provides the majority of antibody-based immunity against invading pathogens. The only antibody capable of crossing the placenta to give passive immunity to the fetus.                                     |  <p>Pentamer:<br/>IgM</p>         |
| IgM         | $\mu$       | Expressed on the surface of B cells as a monomer, and in a secreted form as a pentamer with very high avidity. Eliminates pathogens in the early stages of B cell mediated (humoral) immunity before there is sufficient IgG. |                                                                                                                       |

| Antibody |             | Human and Mouse  |                |                                                                                     |                   |                 |
|----------|-------------|------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
|          | Light Chain | Subtype          | Heavy Chain    |                                                                                     |                   |                 |
| IgA      | κ or λ      | IgA <sub>1</sub> | α <sub>1</sub> |  |                   |                 |
|          | κ or λ      | IgA <sub>2</sub> | α <sub>2</sub> |                                                                                     |                   |                 |
| IgE      | κ or λ      | None             | ε              |                                                                                     |                   |                 |
| IgD      | κ or λ      | None             | δ              |                                                                                     |                   |                 |
| IgM      | κ or λ      | None             | μ              |                                                                                     |                   |                 |
|          |             | Human            |                | Mouse                                                                               |                   |                 |
| IgG      | Light Chain | Subtype          | Heavy Chain    | Light Chain                                                                         | Subtype           | Heavy Chain     |
|          | κ or λ      | IgG <sub>1</sub> | γ <sub>1</sub> | κ or λ                                                                              | IgG <sub>1</sub>  | γ <sub>1</sub>  |
|          | κ or λ      | IgG <sub>2</sub> | γ <sub>2</sub> | κ or λ                                                                              | IgG <sub>2a</sub> | γ <sub>2a</sub> |
|          | κ or λ      | IgG <sub>3</sub> | γ <sub>3</sub> | κ or λ                                                                              | IgG <sub>2b</sub> | γ <sub>2b</sub> |
|          | κ or λ      | IgG <sub>4</sub> | γ <sub>4</sub> | κ or λ                                                                              | IgG <sub>3</sub>  | γ <sub>3</sub>  |



# IgG

obecný vzorec:

$\gamma_2 \lambda_2$  nebo  $\gamma_2 \kappa_2$

průměrná  $M_r = 150$  kDa, H = 50 kDa, L = 25 kDa

**domény** - variabilní (V) a konstantní (C), velikost 80-120 aminokyselin

na N-koncích :

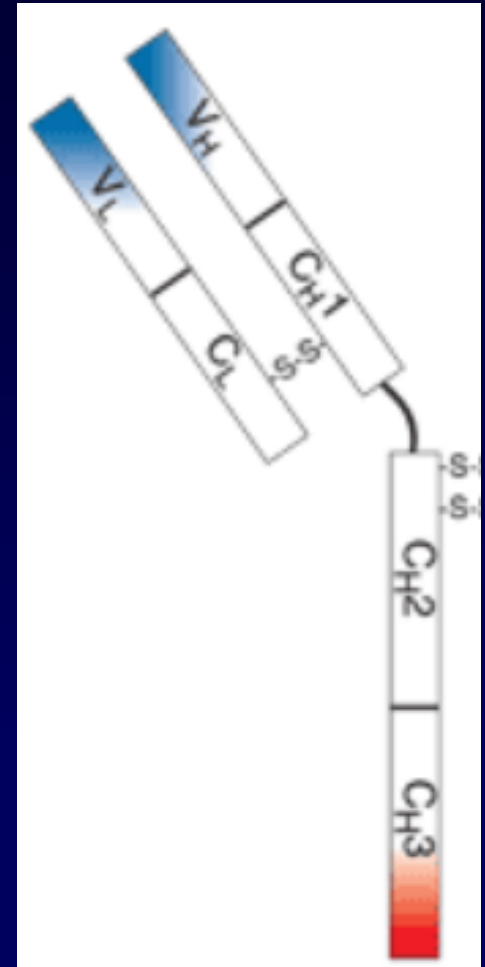
L řetězec: 1x  $V_L$  doména

H řetězec: 1x  $V_H$  doména

na C-koncích :

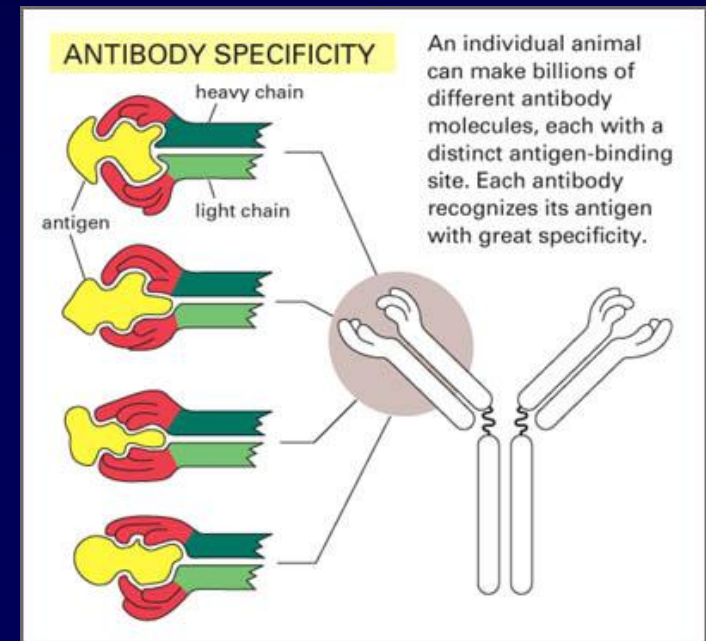
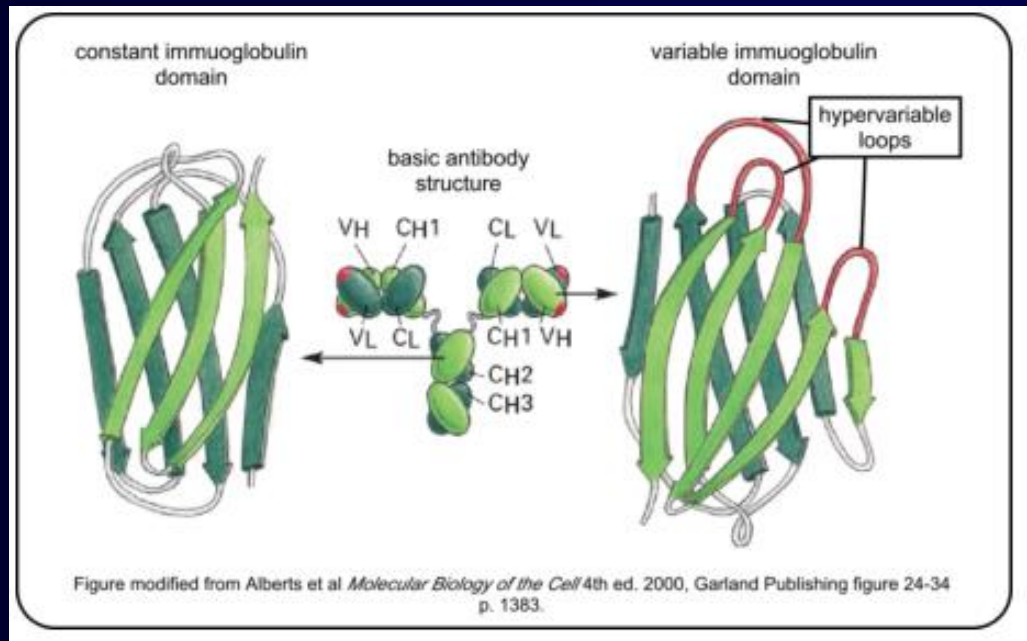
L řetězec: 1x  $C_L$  doména

H řetězec: 3x -  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$



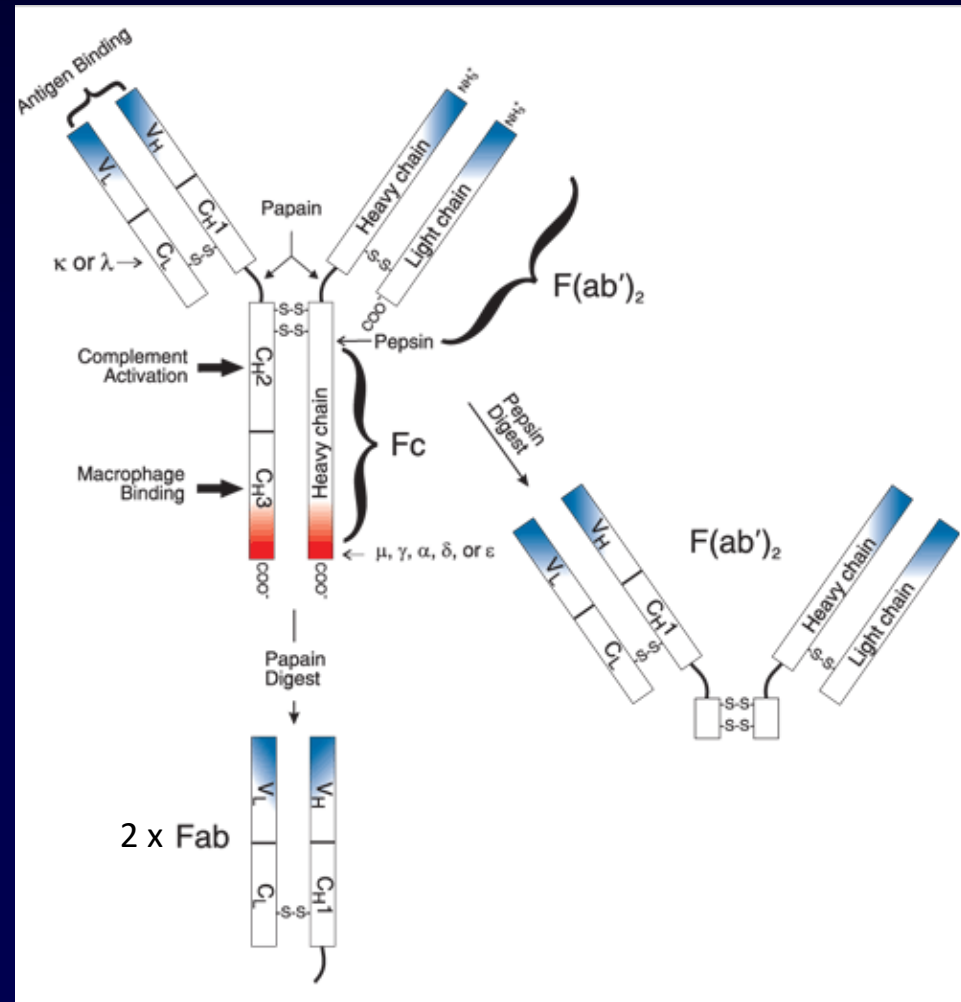
$V_L$  a  $V_H$  tvoří **vazebné místo antigenu**, v této části **hypervariabilní oblasti** – tyto se během reakce s antigenem dostávají nejblíže (0,2 - 0,3 nm)

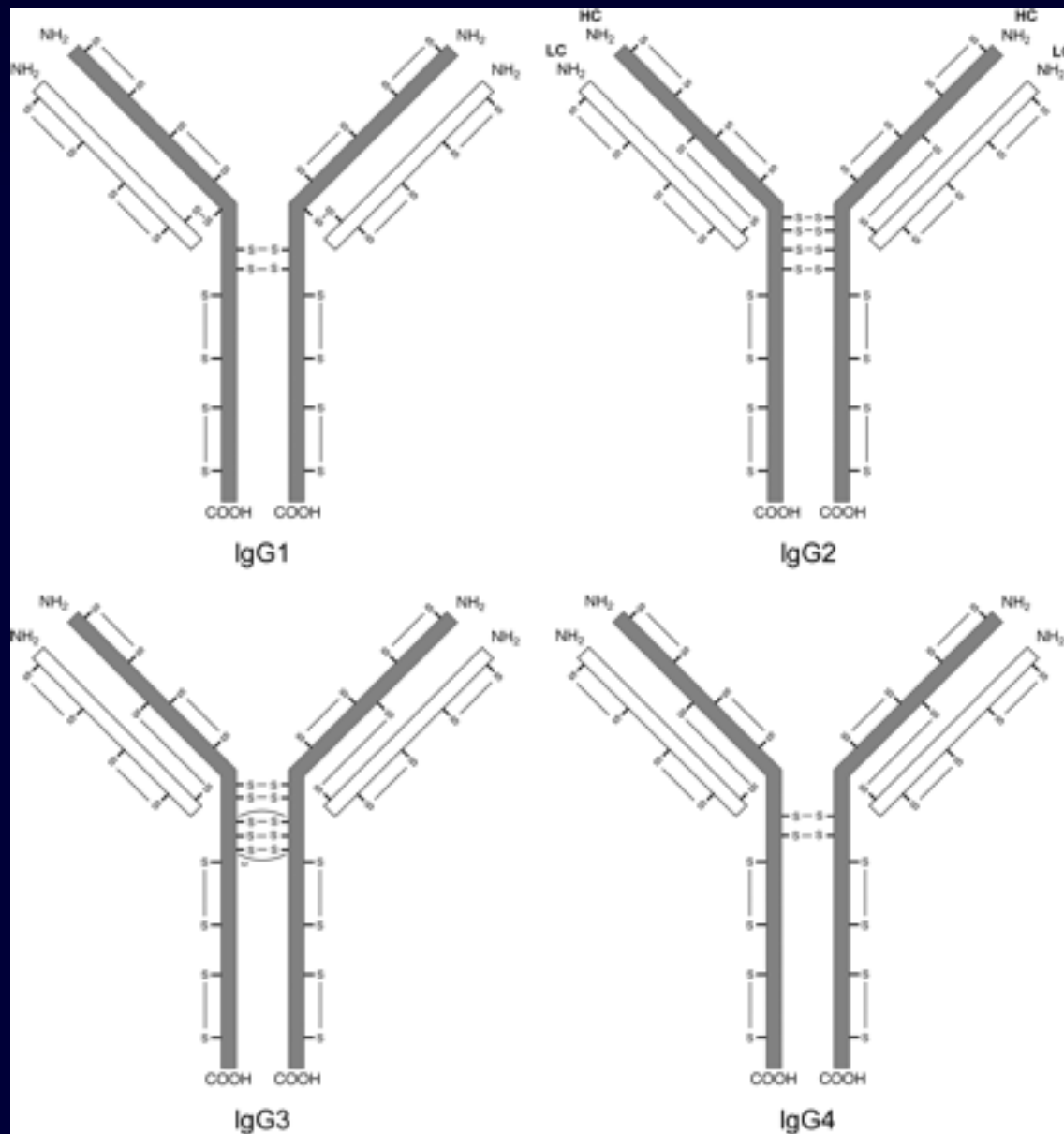
Struktura vazebného místa, která je unikátně charakteristická pro danou protilátku, se nazývá **idiotyp** (tvořena souborem **idiotopů**)  
-> každý klon protilátky má jiný idiotyp



## Struktura – odvozena od enzymatického štěpení

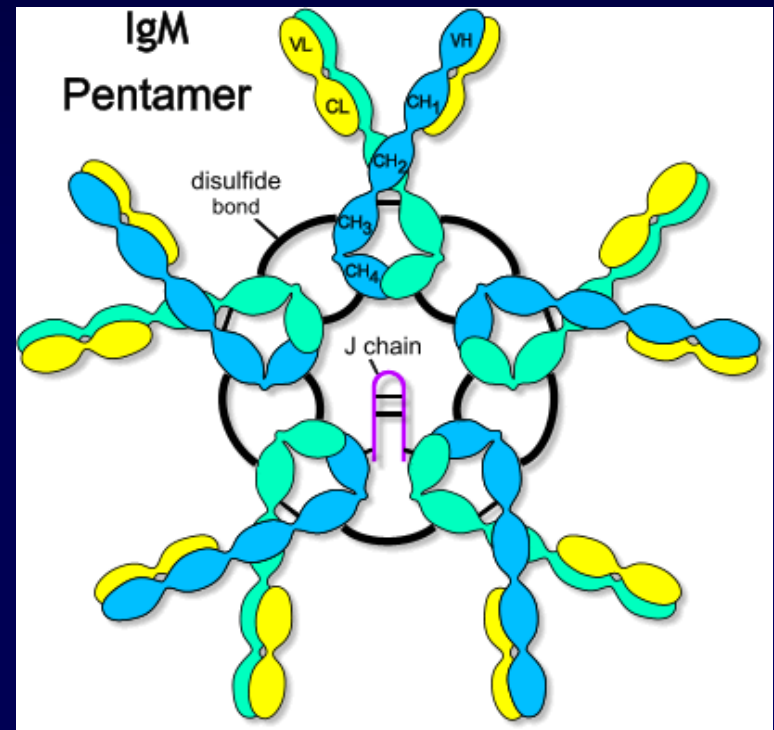
- papain- štěpí v pantové oblasti H řetězce  
vznik:
  - 2x monovalečních **Fab** (Fragment antigen binding)
  - 1x **Fc** (Fragment crystallizable)
- pepsin – štěpí v C-koncové oblasti H řetězce  
vznik:
  - 1x bivalentní **F(ab')<sub>2</sub>**
  - zbytek Fc fragmentu je degradován





# IgM

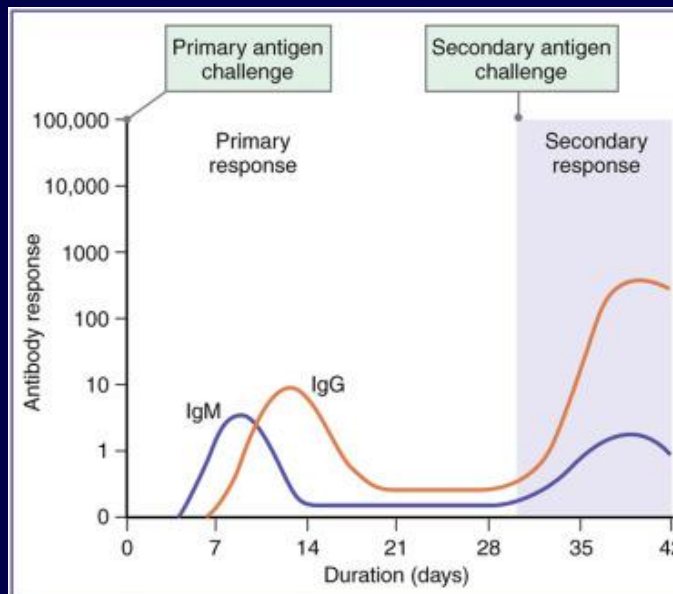
- pentamer,  $M_r = 900\text{kDa}$ , 5x podjednotka po 180kDa
- obecný vzorec  $(\mu_2 \kappa\alpha_2)_5$  nebo  $(\mu_2 \lambda\text{ambda}_2)_5$
- struktura spojena řetězcem „J“ (15kDa)
- stejné štěpení proteinázami jako IgG,
- papain  $\rightarrow$  vznik 10 x Fab a Fc
- pepsin  $\rightarrow$  vznik 5 x  $F(ab')_2$
- Fc - cyklický pentamer (340kDa)



# Tvorba protilátek během imunitní odpovědi

- imunizace antigenem - vyrovnání koncentrace mezi intra a extravaskulárním prostorem
- zachytávání antigenu v uzlinách
- **latentní (indukční) fáze** – asi týden
- první tvorba IgM – **primární odpověď**
- později nebo po další imunizaci (booster) – převážně tvorba IgG – **sekundární odpověď**
- různá délka poločasu - IgM = 4-6 dní, IgG = 3 týdny

## Kinetika imunitní odpovědi





# Polyklonální protilátky pro ICC

- produkce různými klony B- lymfocytů
- reakce s různými epitopy daného antigenu
- nejčastější producent – králík (New Zealand White rabbit) , koza, prase, ovce...



## RAISING ANTIBODIES IN ANIMALS

Antibodies can be made in the laboratory by injecting an animal (usually a mouse, rabbit, sheep, or goat) with antigen A.

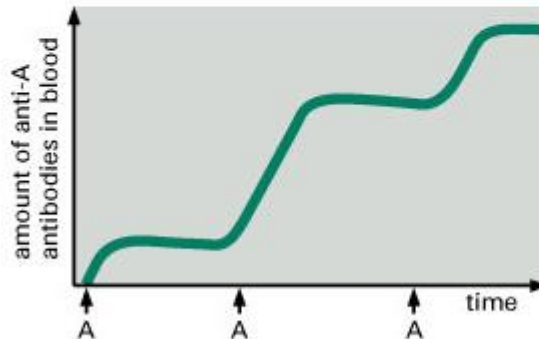


inject antigen A



take blood later

Repeated injections of the same antigen at intervals of several weeks stimulates specific B cells to secrete large amounts of anti-A antibodies into the bloodstream.

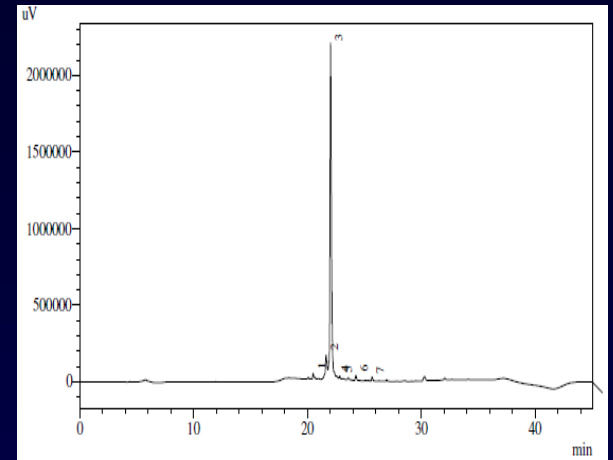


Because many different B cells are stimulated by antigen A, the blood will contain a variety of anti-A antibodies, each of which binds A in a slightly different way.

©1998 GARLAND PUBLISHING

# Příprava polyklonálních protilátek

- navržení a syntéza peptidu (antigen)
- ověření čistoty hmotnostní spektrometrií a chromatografií
- coupling – vazba s KLH glykoproteinem
- KLH – Keyhole limpet hemocyanin
- plž přílipka (*Megathura crenulata*)
- produkce vysoce imunogenního glykoproteinu KLH
- dodá imunogenitu i peptidu



# Příprava polyklonálních protilátek – obecný protokol

- opakovaná imunizace
- kontrola specifity vůči antigenu
- získání séra



## *Immunisation protocol*

- 1) First injection – *day 1*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in complete Freund's adjuvans).
- 2) Second injection – *day 15*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 3) Test sera – *day 20*: 5 mls of test sera
- 4) Third injection – *day 46*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 5) Test sera or final bleed – *day 54*: either 5 mls of the test sera or 50 - 80mls of the final sera.
- 6) Fourth injection – *day 76*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 7) Final sera collection – *day 84*. 50 - 80mls of the final sera.

# Příprava polyklonálních protilátek

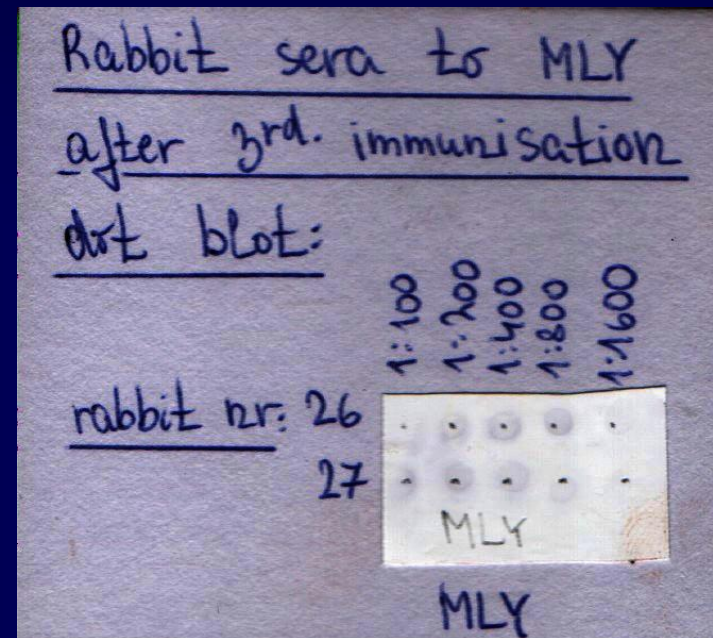
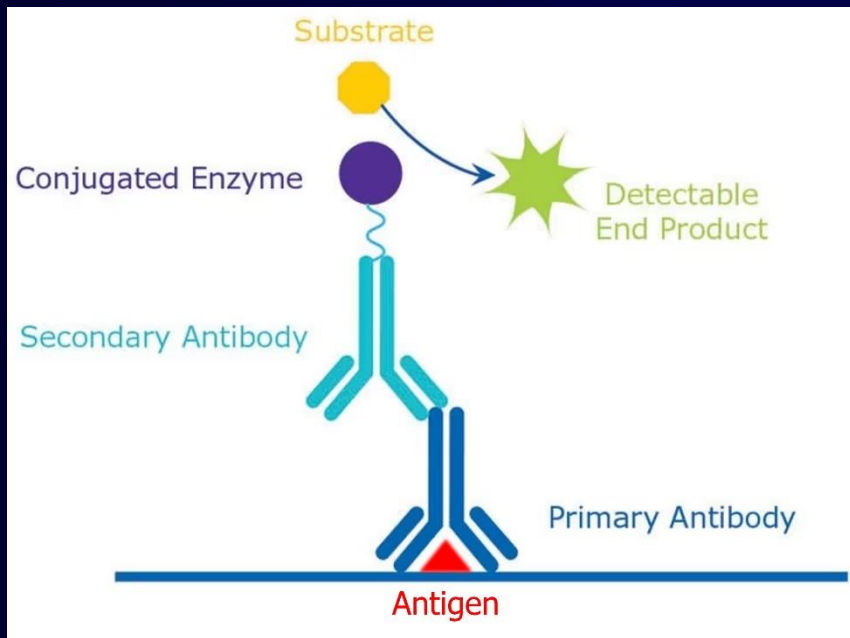
- příklad postupu výroby komerčně objednané protilátky

| Nom | ▼ Date ▲   | Description                                                      |
|-----|------------|------------------------------------------------------------------|
| 1   | 03.12.2009 | Peptide ordered                                                  |
| 2   | 28.12.2009 | Peptide ready                                                    |
| 3   | 05.01.2010 | Peptide coupling via C-terminal cysteine                         |
| 4   | 08.01.2010 | Immunisation of rabbits number 26 and 27: 1st injection          |
| 5   | 29.01.2010 | Immunisation of rabbits number 26 and 27: 2nd injection          |
| 6   | 05.02.2010 | Rabbit sera after second injection of antigen                    |
| 7   | 09.02.2010 | Testing of the sera after 2nd injection of antigen using dotblot |
| 8   | 01.03.2010 | Immunisation of rabbits number 26 and 27: 3rd injection          |
| 9   | 08.03.2010 | Rabbit sera after third injection of antigen                     |
| 10  | 11.03.2010 | Testing of the sera after 3rd injection of antigen using dotblot |
| 11  | 01.04.2010 | Immunisation of rabbits number 26 and 27: 4th injection          |
| 12  | 08.04.2010 | Final bleed after fourth injection of antigen                    |

# Ověřování afinity protilátky k antigenu

metoda: dot-blot

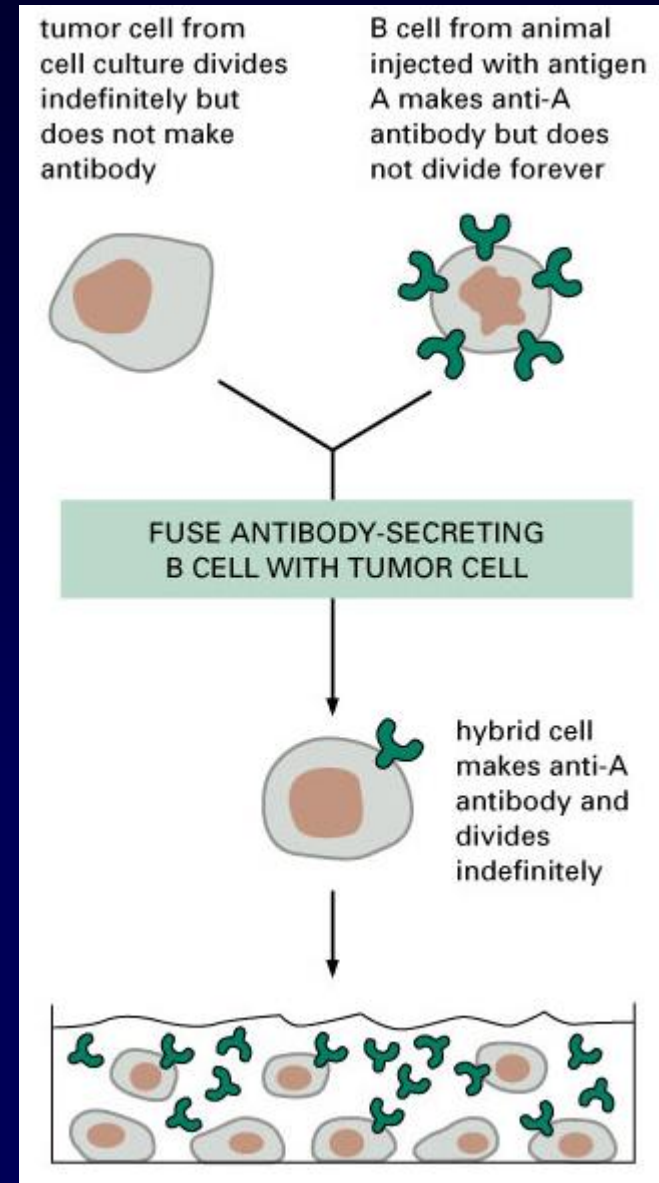
- 1) na membránu nanesen antigen
- 2) kapka různě ředěné protilátky
- 3) detekce anti-králičí protilátkou konjugovanou s chromogenem





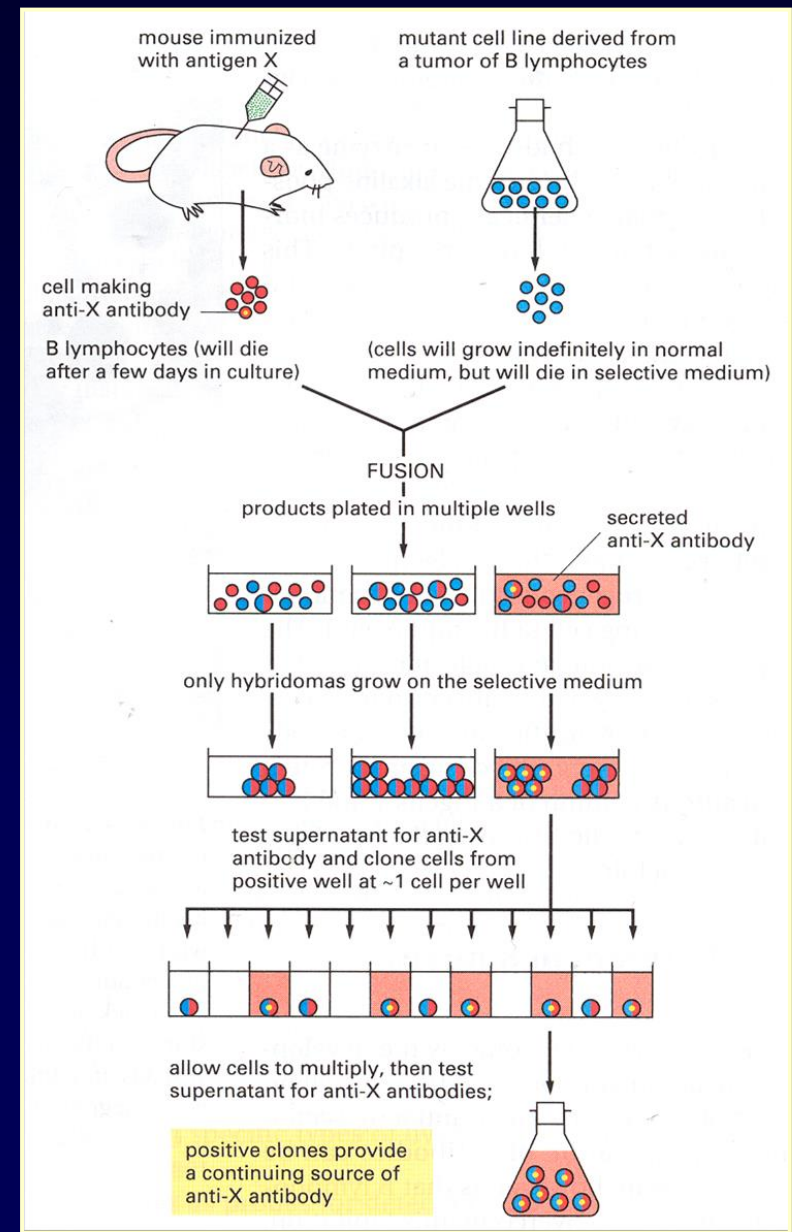
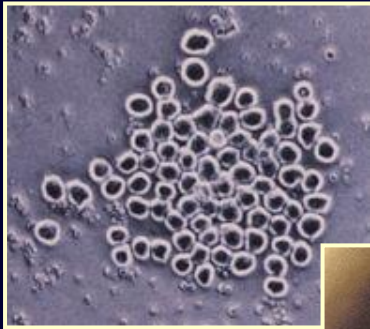
# Monoklonální protilátky pro ICC

- produkovány pouze jedním klonem B-lymfocytů
- všechny molekuly imunoglobulinu jsou totožné
- reagují pouze s jedním specifickým epitopem na antigenu
- nejčastěji myší (ale jsou i jiného původu)
- příprava pomocí hybridomů: fúze B-lymfocytu a myelomové b.





# Tvorba monoklonálních protilátek





[https://www.youtube.com/watch?v=lanViNBr88U&ab\\_channel=CreativeDiagnostics](https://www.youtube.com/watch?v=lanViNBr88U&ab_channel=CreativeDiagnostics)

# První monoklonální protilátka (1975)

- myší monoklonální protilátka – klon Sp1 (IgM)
- proti SRBC (sheep red blood cells)
- fúze myších buněk z myelomu a sleziny

*Nature Vol. 256 August 7 1975*

## Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

G. KÖHLER  
C. MILSTEIN

*MRC Laboratory of Molecular Biology,  
Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK*

**Myeloma cells** ( $10^7$  P3-X67A g8) were fused to  $10^8$  **spleen cells** from an immunised BALB/c mouse. Mice were immunised by intraperitoneal injection of 0.2 ml packed SRBC diluted 1:10, boosted after 1 month and the spleens collected 4 d later. After fusion, cells (Sp-1) were grown for 8 d in HAT medium, changed at 1–3 d intervals. Cells were then grown in Dulbecco modified Eagle's medium, supplemented for 2 weeks with hypoxanthine and thymidine. Forty days after fusion the presence of anti-SRBC activity was revealed as shown in *a*. **The ratio of plaque forming cells/total number of hybrid cells was 1/30.**

# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984



Photo from the Nobel  
Foundation archive.

Niels K. Jerne

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel  
Foundation archive.

Georges J.F. Köhler

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel  
Foundation archive.

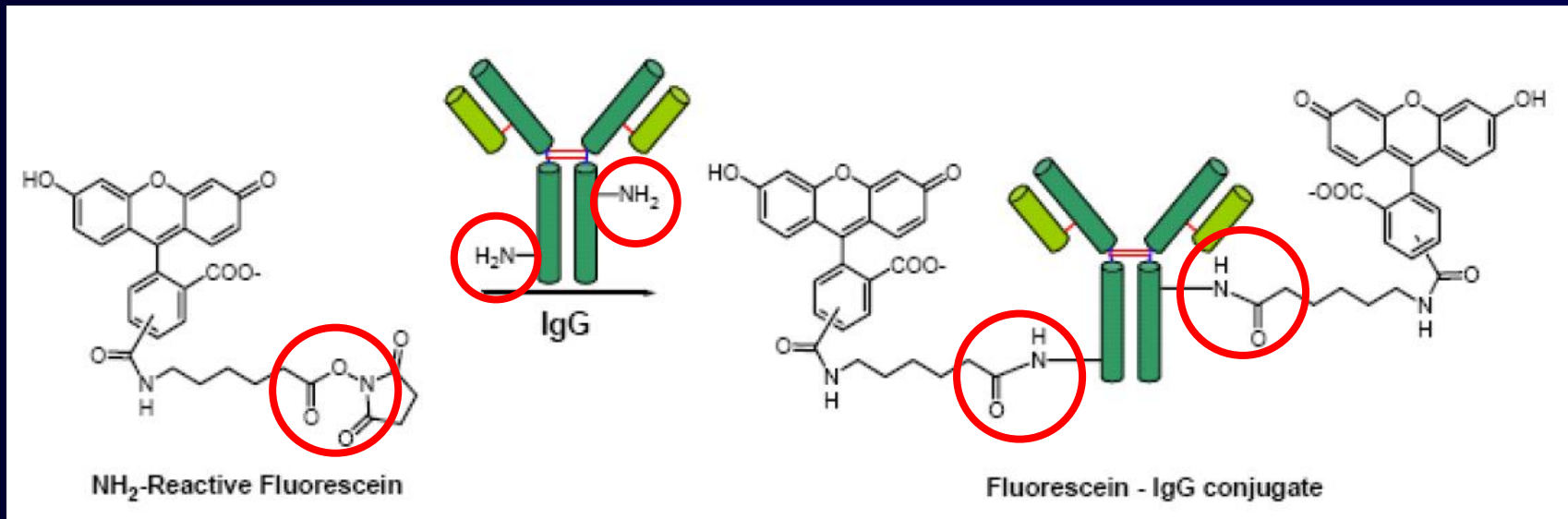
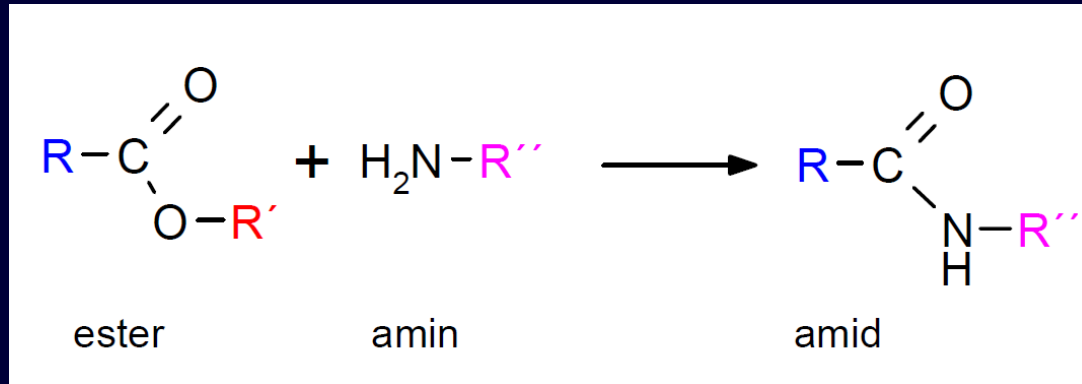
César Milstein

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984 was awarded jointly to Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler and César Milstein for theories concerning „**the specificity in development and control of the immune system**“ and the discovery of „**the principle for production of monoclonal antibodies**“.

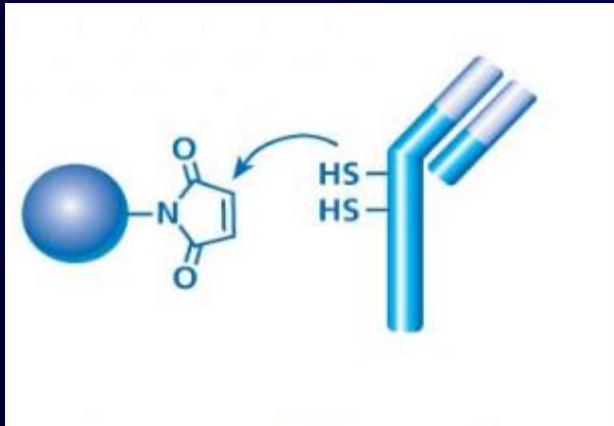
# Konjugace protilátky s fluorochromem

- vazba přes aminoskupinu ( $-\text{NH}_2$ ), vznik amidu



# Konjugace protilátky s fluorochromem

- vazba přes thiolovou skupinu (-SH)
- nutné v redukujícím prostředí – porušení disulfidických vazeb
- vyšší senzitivita konjugátu – specifitější místo značení





# Přímá vs. nepřímá imunofluorescence

- přímá imunofluorescence – původní metoda (1942)
- přímá vazba protilátky s fluorochromem na antigen
- rychlá, méně univerzální, nižší intenzita signálu
- využití pro flow-cytometrii



fluorochrom

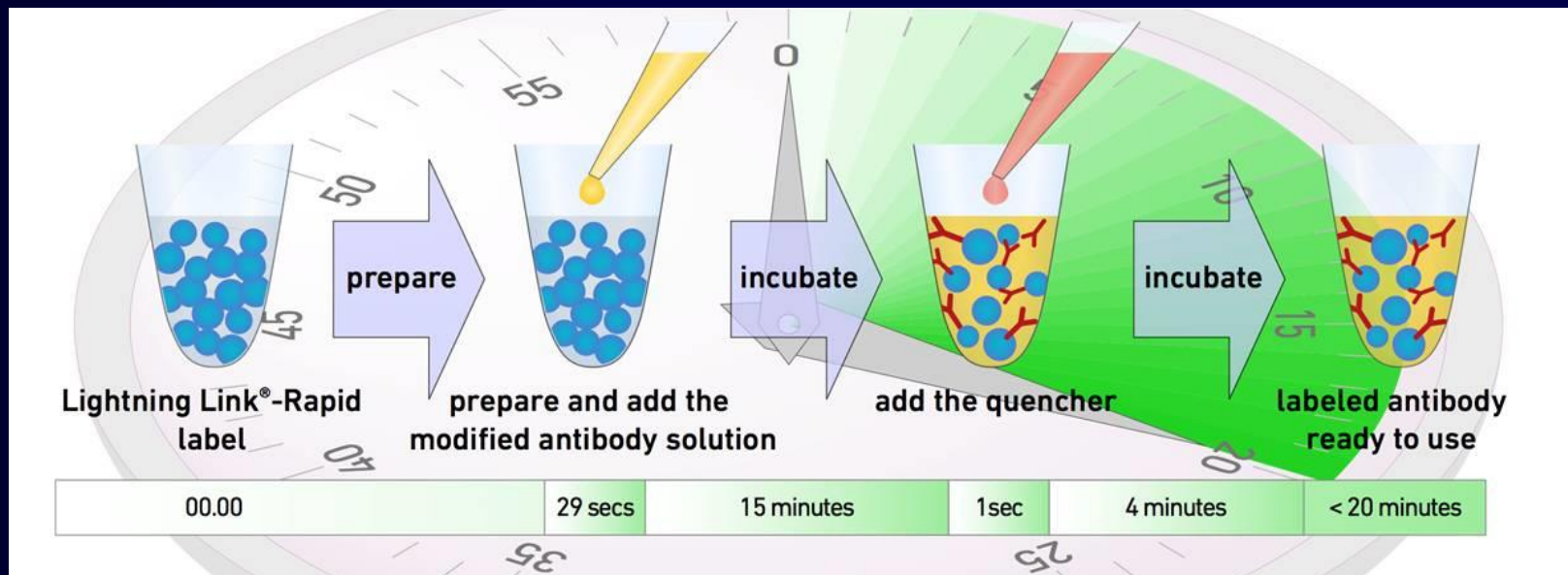
imunoglobulin

epitop antigenu



# Přímá imunofluorescence

- a) značená protilátka od dodavatele
- b) vlastní označení zvolené protilátky vybraným fluorochromem

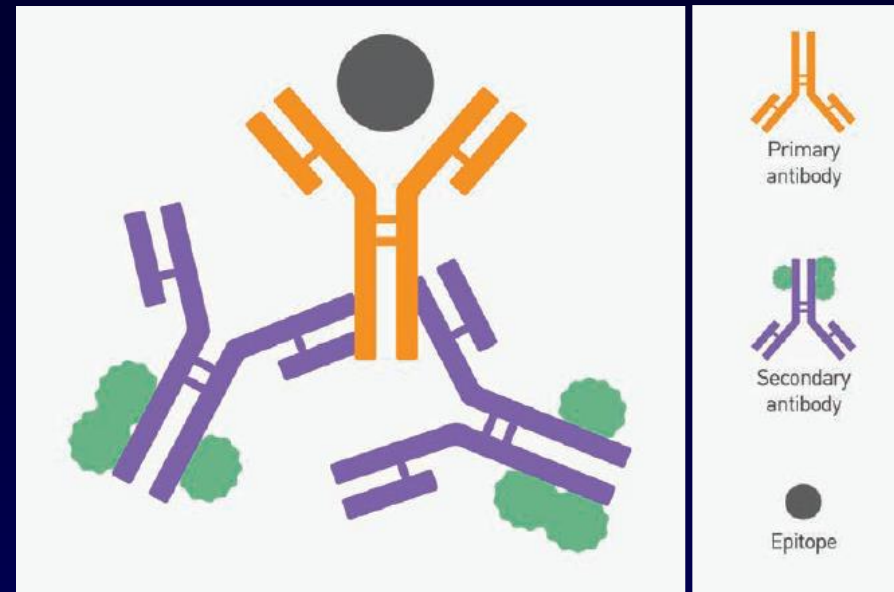


Innova Biosciences, Lightning-Link®

# Nepřímá imunofluorescence

dvoukroková

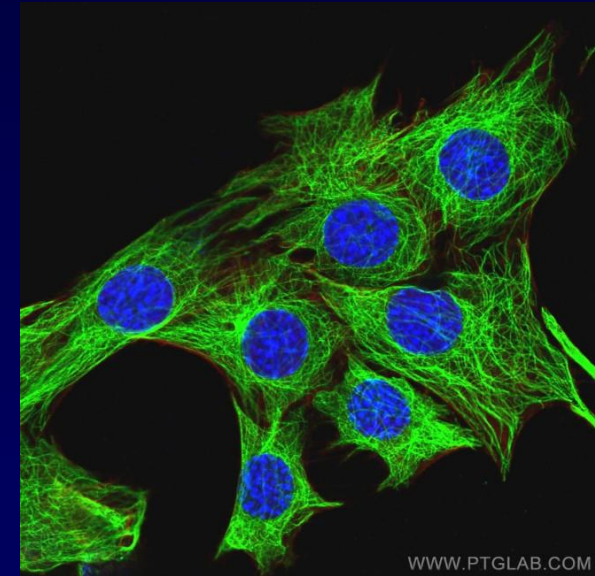
- 1) primární protilátka x antigenu
- 2) sekundární značená protilátka x primární protilátce



- univerzální, více primárních protilátek z jednoho organismu lze kombinovat s jednou sekundární protilátkou
- vyšší citlivost - na I. Ab více rozeznatelných epitopů, více navázaných molekul II. Ab se značkou

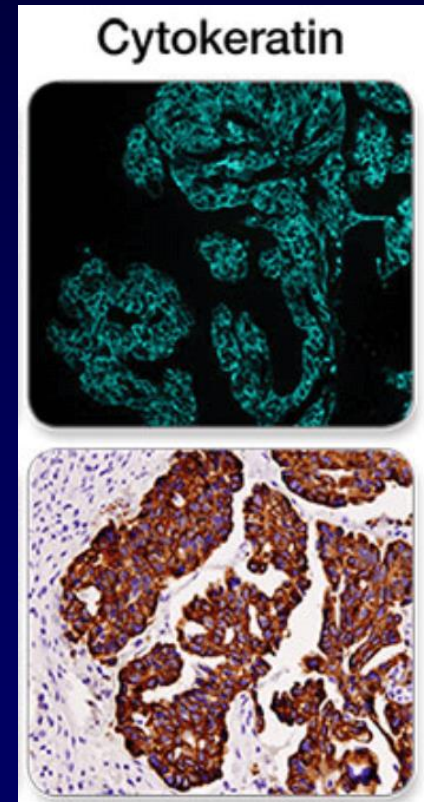
# Základní postup imunofluorescenčního barvení buněčných kultur = ICC

- 1) fixace
- 2) permeabilizace
- 3) blokování nespecifických vazeb
- 4) inkubace s protilátkou / protilátkami
- 5) counterstaining (detekce DNA)
- 6) montování



# Základní postup imunofluorescenčního barvení tkáňových řezů = IHC

- 1) parafínové řezy ( $\pm 4 \mu\text{m}$ ) na podložním skle
- 2) deparafinizace – xylén
- 3) rehydratace – sestupná alkoholová řada
- 4) reaktivace antigenů (antigen retrieval) v tlakové komoře při vyšší teplotě ( $97^\circ\text{C}$ )
- 5) blokování nespecifických vazeb
- 6) inkubace s fluorescenčně označenou protilátkou/-ami (protilátka s enzymem + chromogen – klasická IHC)
- 7) counterstaining
- 8) montování



# Fixativa

## požadavky

- rychle proniká do buňky/tkáně
  - fixuje b. struktury a zabraňuje reakci buňky a tím vzniku strukturálních artefaktů
  - zamezí ztrátě rozpustných proteinů
  - nesmí vykazovat autofluorescenci
  - rozdíly v závislosti na detekované struktuře
- 
- chemická fixativa
  - mrazová substituce
  - mikrovlnná fixace

# Chemická fixativa

## koagulační chemická fixativa

- MetOH – nejčastěji -20°C, bez permeabilizace
- EtOH
- aceton

## výhody

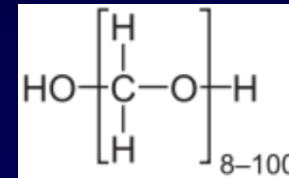
- rychlá fixace, díky dehydrataci
- proteiny jsou koagulovány nebo extrahovány
- zachovává rozpoznání antigenu

## nevýhody

- výrazné smrštění vzorku (až o 50%)
- zkreslení morfologie a velikosti

# Crosslinkující chemická fixativa

vytváří metylenové vazby  $-\text{CH}_2-$  (crosslinks) mezi různými skupinami makromolekul



nejčastěji paraformaldehyd (4% PFA)

- reaktivní skupiny: amidová, guanidinová, thiolová, fenolová, imidazolová a indolylová
- crosslinky i v nukleových kyselinách (ne však v lipidech)
- pomalejší vytváření crosslinků, ale rychlejší průnik do buňky (než glutaraldehyd)
- toxický, potenciální karcinogen



# Permeabilizace

- použití v závislosti na umístění detekované molekuly
- na externí straně pl. membrány – netřeba
- po fixaci aldehydy, nutnost permeabilizovat membránu, aby mohly být detekovány intracelulární molekuly
- použití organických rozpouštědel nebo detergentů

nejčastěji:

- TRITON X-100 (0,1-1%),
- Tween 20
- NP-40 (= Igepal)
- Brij...



# Blokování nespecifických vazeb

nutnost vyvázání:

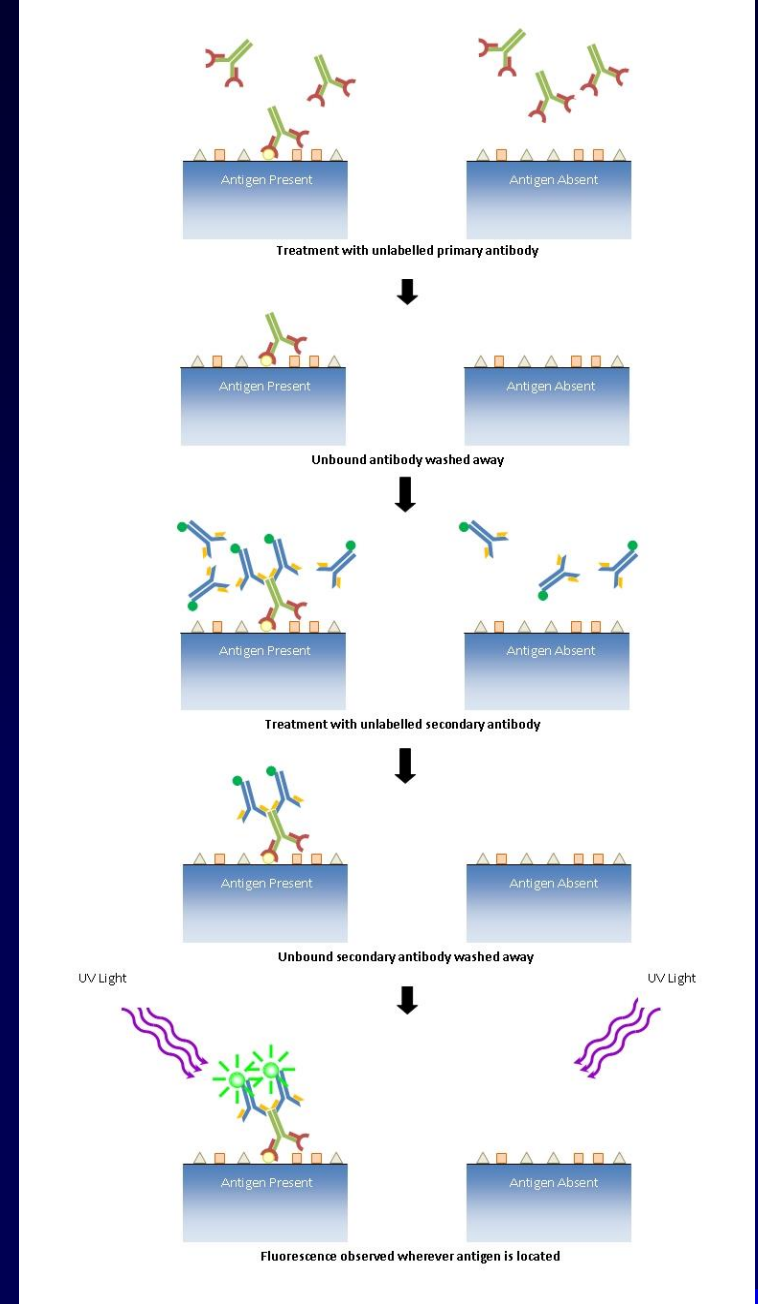
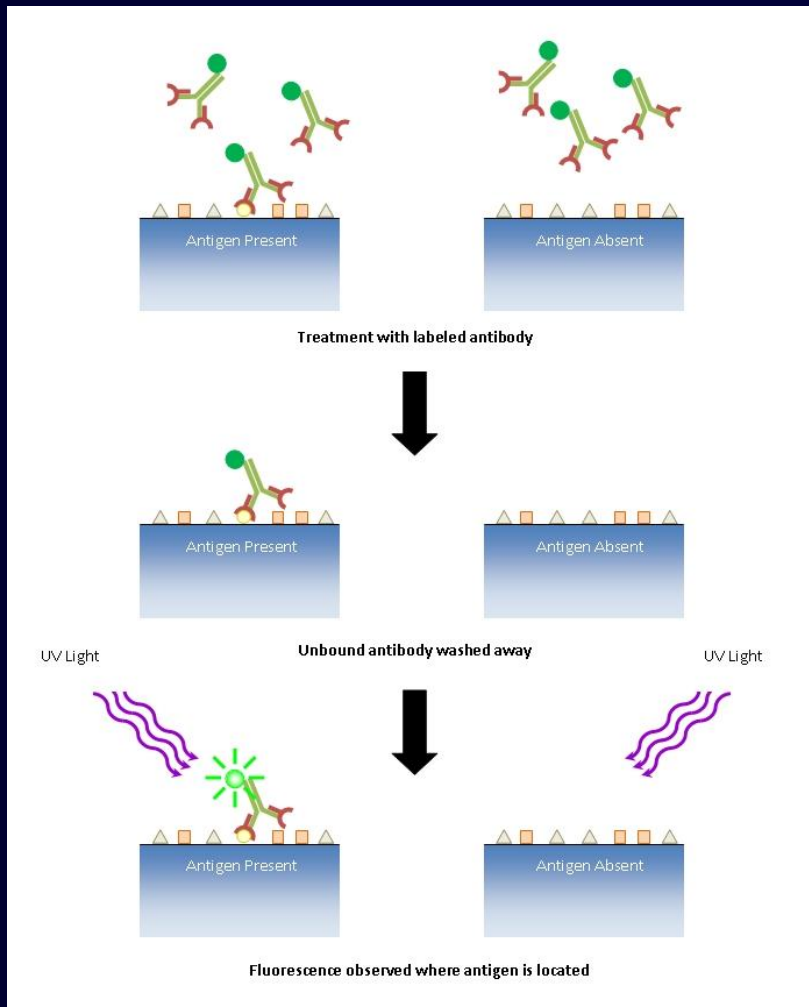
- nespecifických vazebných míst, na která by mohla nasednout protilátka
- nevymytého fixativa
- polárních nebo velmi hydrofobních struktur
- zvyšuje specifitu protilátky
- snižuje signál z pozadí

nejčastěji používané:

- bovinní sérový albumin (BSA): 1-10%,
- sérum (ze stejného zvířete jako II. Ab, nebo jiné než I. a II. Ab)
- želatina



# Přímá a nepřímá imunofluorescence



# Dvojité značení - nepřímá imunofluorescence

## **Immunofluorescence**

**June Cheng, Thomas Kemmerly**

**Adrienne Williams and Diane K. O'Dowd**

**Dept. of Developmental and Cell Biology, UCI, Irvine, CA 92697-1280**

**Sponsored by: HHMI Professor Grant to DKOD**

**Keywords: Cell, Biology, Stain, Immunofluorescence, Mitochondria  
Nucleus, Antigen, Antibody**



<https://www.youtube.com/watch?v=OH2GFeaGV6w>

# Celkový postup - nepřímá imunofluorescence



<https://www.youtube.com/watch?v=pteO6FRWo3g>

## Negativní kontrola

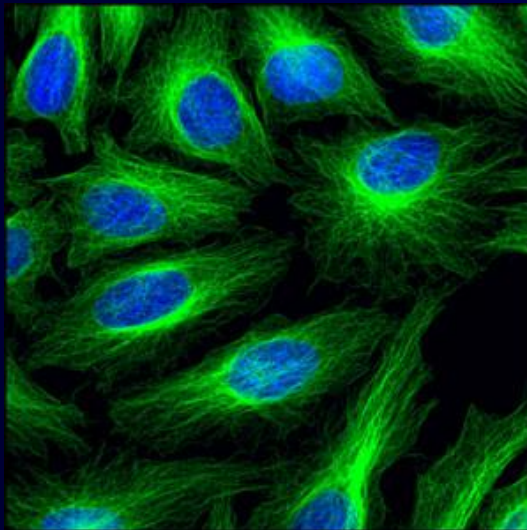
- nutné pro vyloučení falešných výsledků
- vícenásobné značení – kontroly pro jednotlivé fluorochromy
- použití isotypové kontroly – stejný typ protilátky s fluorochromem bez specifity
- použití neznačených buněk – vyloučení autofluorescence



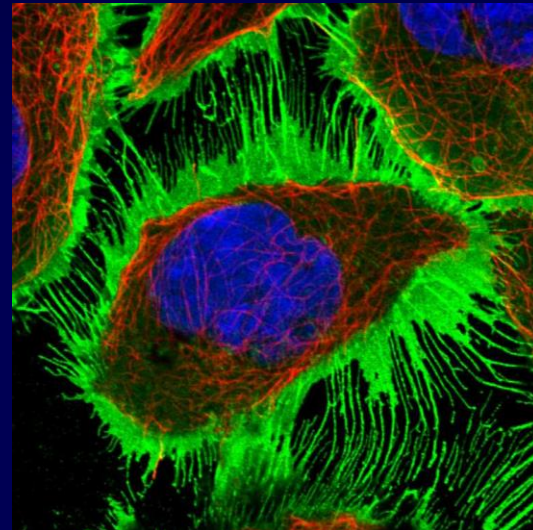


## Pozitivní kontrola

- detekce „ověřeného“ proteinu (tubulin, aktin)
- linie s ověřenou expresí daného proteinu
- transfekovaná linie s over-expresí daného proteinu



HeLa:  $\alpha$ -tubulin



A431: EGFR



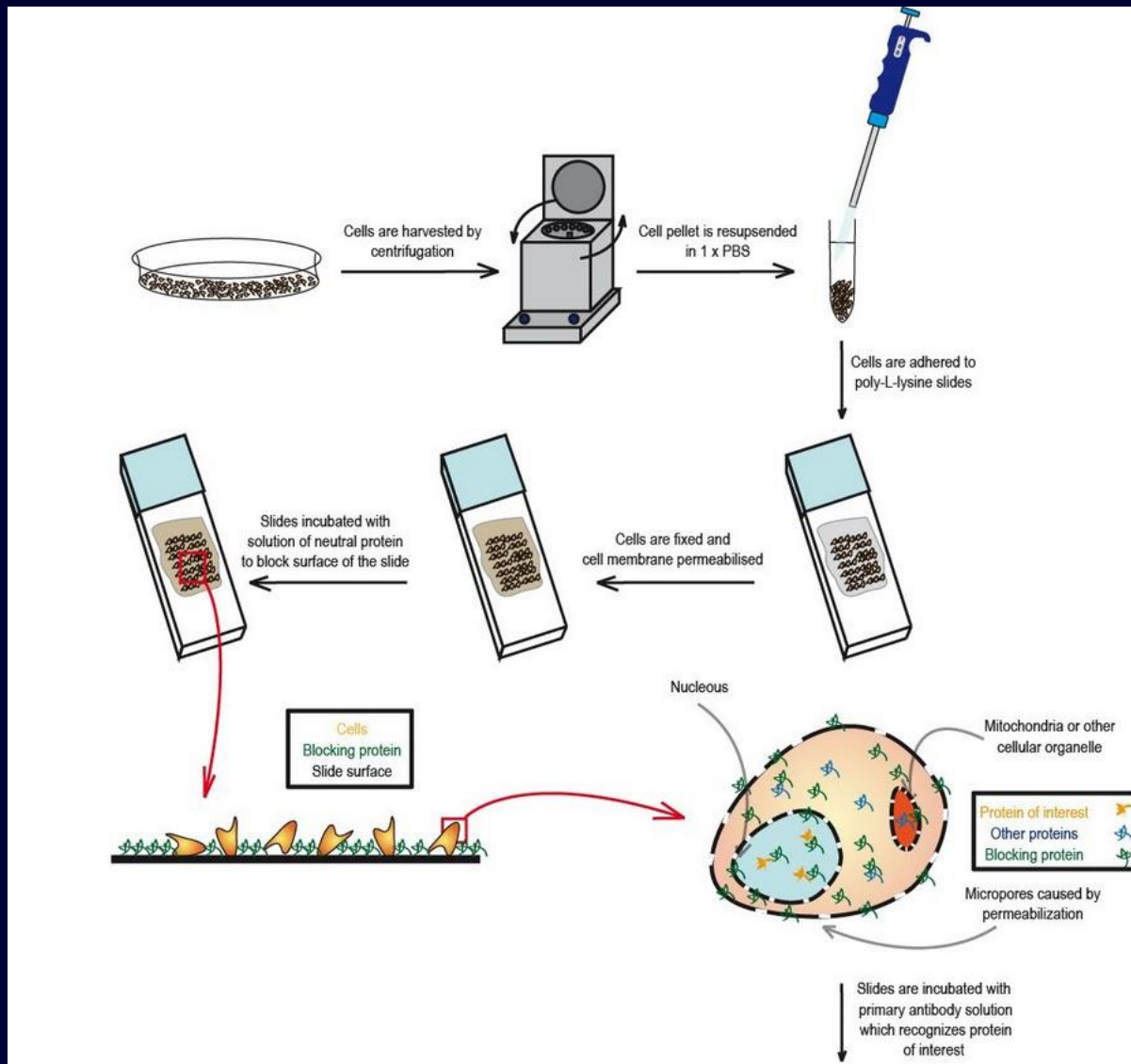
# Montování = uzavírání

- uchování preparátu na delší dobu
- bez přístupu vzduchu
- v prostředí bránícím vyhasínání fluorescence
- mohou současně označovat nukleové kyseliny (+DAPI, aj.)

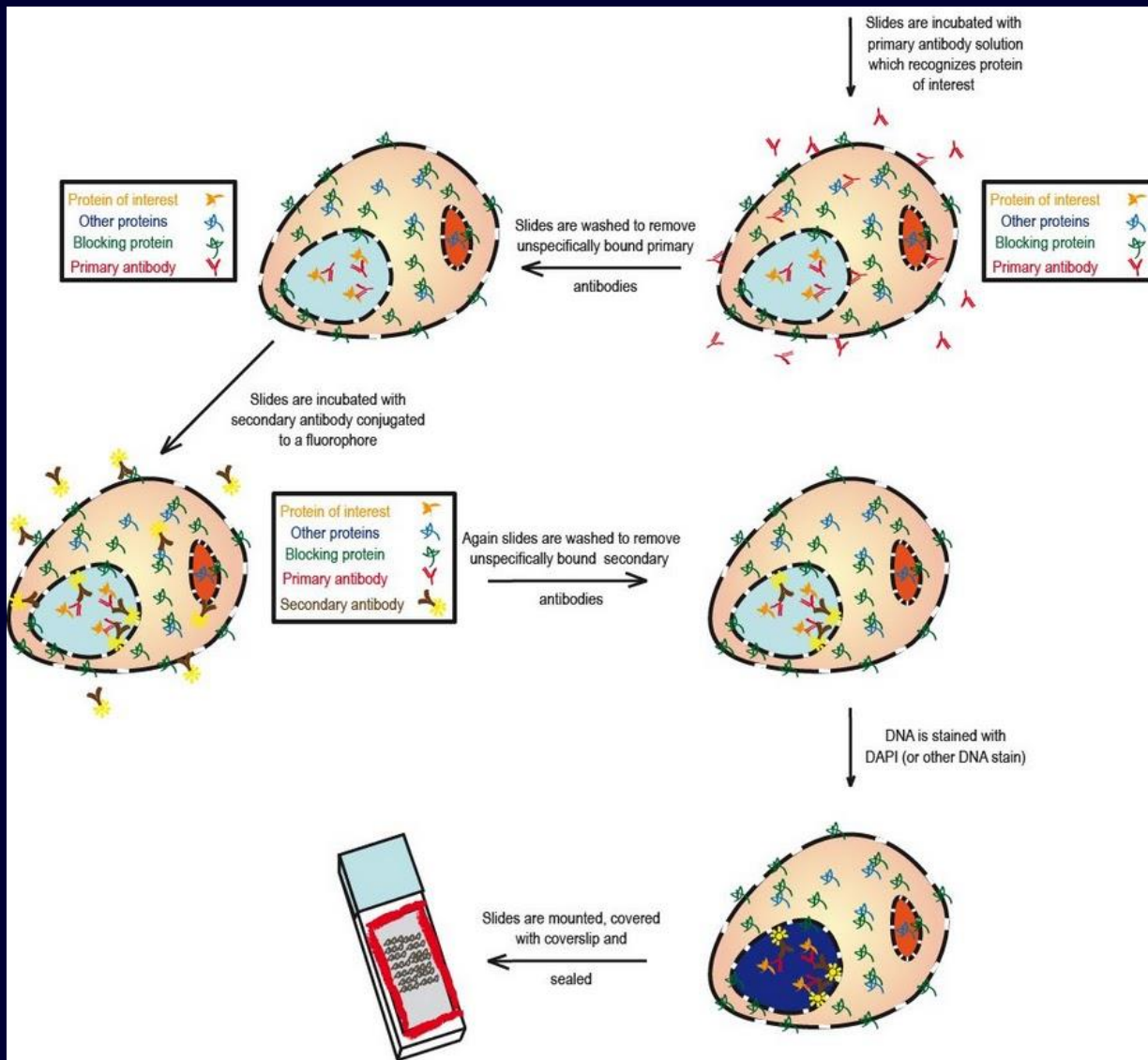
## tuhnoucí vs. netuhnoucí montovací média

- na bázi polyvinyl alkoholu (např. Mowiol) – tuhne
- na bázi glycerolu (např. Vectashield) – potřeba zarámovat sklo – gel, parafín, lak na nehty..

# Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 1. část



# Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 2. část

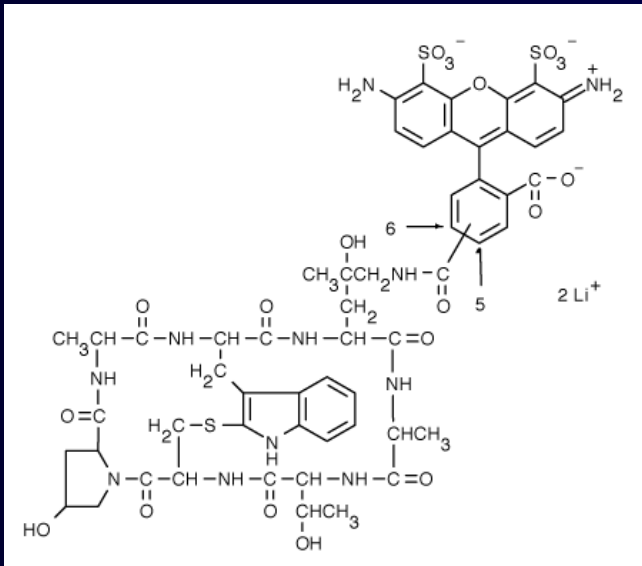


## Nepřímá vazba fluorochromu – značky

navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, phalloidin..

## Phalloidin

- mykotoxin - obsažen v některých jedovatých druzích muchomůrek
- *Amanita phalloides* - muchomůrka zelená (obsah přibližně 0,01 %)
- inhibice depolymerizace aktinových filament
- vazba na F-aktin
- konjugace s fluorochromy

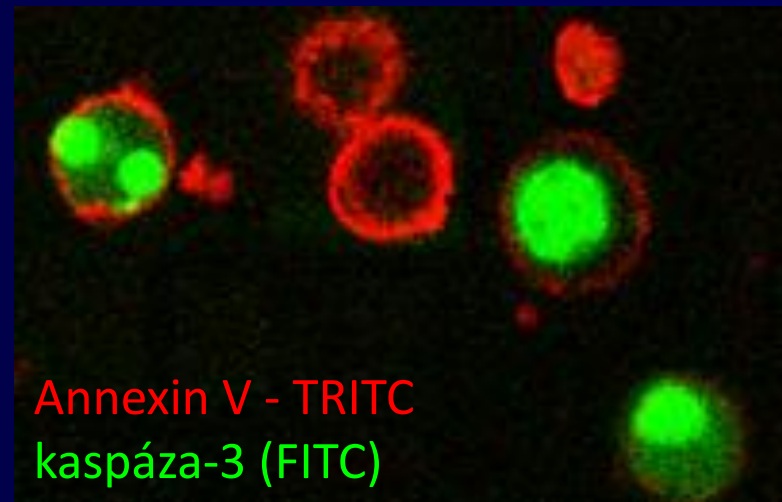
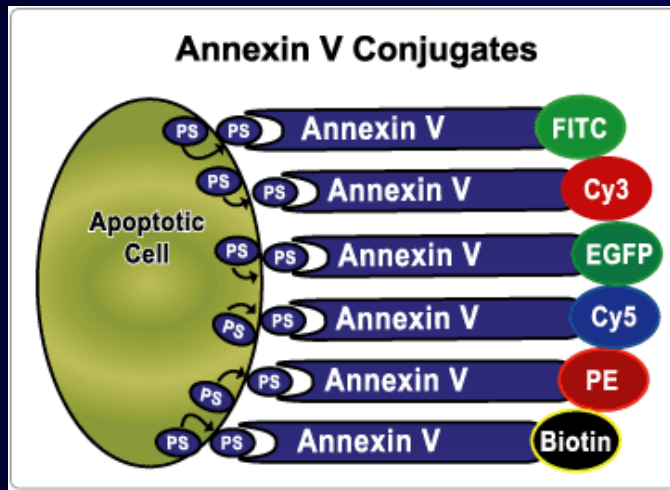
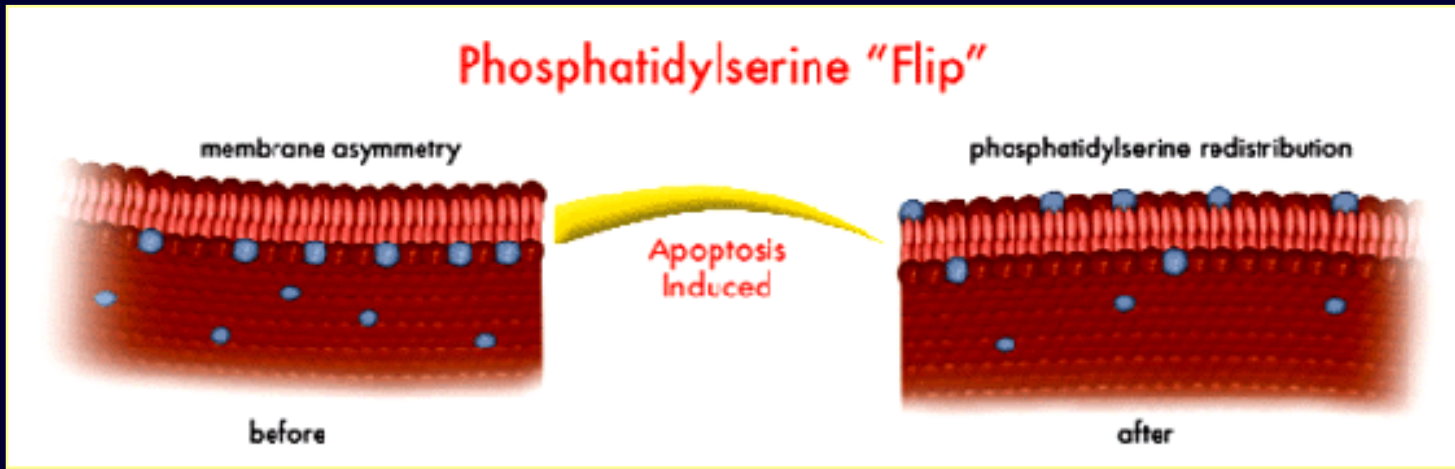


Alexa Fluor 488 phalloidin



# Annexin V + fluorochrom

## detekce fosfatidylserinu („eat me“ signal) v apoptóze





# Interaktivní materiály

- <http://www.proteinatlas.org/>
- <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/products/protein-biology/antibodies>
- <http://www.abcam.com/>
- <https://www.scbt.com/scbt/home/>
- <http://www.cellsignal.com/index.jsp>
- <http://www.agilent.com/en/dako-products>
- <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/molecular-probes.html>
- <http://www.protilatky.cz/>